

**University of Groningen**

## **Insights into the transport mechanism of energy-coupling factor transporters**

**Stanek, Weronika Karolina**

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Stanek, W. K. (2018). *Insights into the transport mechanism of energy-coupling factor transporters*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Vitamines zijn essentiële nutriënten voor organismen. Veel organismen zijn afhankelijk van cofactoren die worden opgenomen vanuit de omgeving. Hoewel er bio-synthetische routes voor de productie van deze moleculen zijn hebben sommige organismen geen complete bio-synthetische route ontwikkeld en halen de bouwstenen hierom uit de extracellulaire omgeving.<sup>1</sup> Hiervoor vindt selectieve opname plaats d.m.v. transporteiwitten in het celmembraan. Het belang van transportsystemen voor de opname van nutriënten is zichtbaar in de hoeveelheid genen die transleren voor transporteiwitten in het prokaryotische genoom (tot wel 16%).<sup>2</sup> Transporters zijn eiwitten die vaak geoptimaliseerd zijn voor de opname van specifieke substraten of een groep substraten. De mechanismen onderliggend aan het transport kunnen daarbij sterk variëren. Het is enorm interessant hoe in de natuur verschillende oplossingen zijn geëvolueerd voor het transport van zo'n diversiteit van opgeloste stoffen.

Ons werk concentreert zich rondom Energy-Coupling Factor (ECF) transporters.<sup>3</sup> Deze unieke transporters gebruiken de energie opgeslagen in de vorm van ATP om het transport van vitamines en micronutriënten over het lipiden membraan te transporteren.<sup>3-7</sup> De architectuur van ECF transporters is modulair.<sup>8-10</sup> Over het algemeen zijn er vier zogenoemde bouwstenen die samen een volledig complex vormen. Twee, ABC-type nucleotide-bindingsdomeinen (EcfA en EcfA'), twee transmembraan eiwitten (EcfT en EcfS, de laatste wordt ook wel S-component genoemd). Volgens het huidige transport model voor ECF transporters<sup>6</sup> moet het S-component, dat verantwoordelijk is voor de binding van het substraat, gedissocieerd zijn van het volledige complex om substraat te binden. Deze kantelt vervolgens tot een rechtstaande conformatie zodat de bindingsplek aan de extracellulaire zijde wordt onthuld. Van hieruit is het mogelijk om opeenvolgende moleculen te transporteren. Door radio gelabelde vitamines te gebruiken in onze opname experimenten zijn wij in staat om te bewijzen dat dissociatie en vervolgens associatie optreedt gedurende de transport cyclus.

In dit proefschrift onderzoeken wij de moleculaire transportmechanismen van ECF transporters. In den beginne met *in vivo* competitie experimenten die onomstotelijk bewijs leveren dat de S-component uitwisselt op de koppelingsplek van de ECF-module (**Hoofdstuk 2**). Wij reproduceren experimenten uit eind jaren 70, maar ditmaal in een *E. Coli* stam zonder natuurlijke ECF transporters of een van de componenten. In dit 'schone' systeem is overduidelijk substraat afhankelijke competitie tussen S-componenten geobserveerd. Wij bevestigen in het geval van niacin en thiamine transport dat de aanwezigheid van het toegewijde S-component en een functioneel ECF-module noodzakelijk is voor transport. Wij zijn in staat om uitwisseling van S-componenten met het volledige complex te laten zien. Voor Type II ECF transporters competeren verschillende S-componenten voor een gedeelde ECF-module en de competitie is sterker voor substraat gebonden S-componenten.

De volgende stap was de reconstitutie van ECF transporters in proteoliposomen en de observatie van hun dynamische gedrag *in vitro*. In **Hoofdstuk 3**, bestuderen we Panthothenate en folate specifieke transporters. Het was mogelijk om een opname experiment voor pantothenate specifieke transporters op te zetten en deze te combineren met het experiment voor de folate transporter.<sup>6</sup> Wij laten overduidelijk zien dat S-componenten, hoewel verschillend in aminozuur sequentie (PanT en FolT2) functionele complexen kunnen vormen met dezelfde ECF-module. Opname experimenten met co-gereconstitueerde ECF-PanT en enkel FolT2

bevestigen de uitwisseling tussen S-componenten in liposomen.

Daarnaast hebben wij de uitwisseling getest tussen twee transport complexen, specifiek voor pantothenate en folate, co-gereconstitueerd met één ECF-module die de E naar Q mutatie bevat. Deze mutatie veroorzaakt geen tot sterk gereduceerde ATPase activiteit wat leidt tot het vastlopen van de transport cyclus.<sup>11-12</sup> De S-component van de geïnactiveerde mutanten van ECF-PanT en ECF-FolT2 was in staat om de toegewijde vitamine te transporteren in de aanwezigheid van een functioneel ECF-module. Het is mogelijk dat de dissociatie van de S-component spontaan geschiedt als resultaat van de monster preparatie of de mutanten hebben residuale activiteit die leidt tot het loskoppelen van de S-component. Wij observeerden ook substraat afhankelijke competitie van de S-component voor een gedeelde ECF-module. Ons plan was om Single-molecule FRET te gebruiken om associatie en dissociatie van S-componenten op moleculair niveau te observeren. Voorlopige data ondersteund de hypothese van ATP geïnduceerde dissociatie van de S-component. Helaas kampen wij met een slechte monster kwaliteit, waardoor het nodig is om het monster te optimaliseren voor microscopie studies (**Hoofdstuk 4**).

In **Hoofdstuk 5** zijn wij begonnen met een uitgebreide biochemische karakterisatie van ECF-PanT en ECF-FolT2 gereconstitueerd in proteoliposomen. Het blijkt dat deze twee transporters van *Lactobacillus delbrueckii* een vergelijkbare substraat binding en transport kinetiek bevatten. Daarnaast is de invloed van pantothenate en folate analogen op transport getest wat leidde tot de kennis die we nu hebben van specificiteit en binding. We bewijzen ook dat alleen Mg-ATP transport van substraten in ECF-transporters ondersteund. Dit feit bevestigt dat hydrolyse een noodzakelijke stap is in de transportcyclus van ECF-transporters. Vanwege de hoge gevoeligheid van de bestudeerde transporters voor de aanwezigheid van lipiden en voor een breder perspectief van de transportmechanismen zijn wij begonnen met het bestuderen van de invloed van lipiden op de stabiliteit en activiteit van ECF-transporters (**Hoofdstuk 6**). De voorlopige resultaten suggereren dat ECF-PanT een hogere transportactiviteit heeft wanneer proteoliposomen meer fosfatidylethanolamine (PE) bevatten. Daarnaast, laat massa spectrometrie data zien dat PE de hoofdzakelijke co-gezuiverde lipid met ECF-PanT en ECF-FolT2 is. Hierop hebben wij ook de lipiden bepaald co-gezuiverd met de tot over-expressie gebrachte S-componenten (BioY en ThiT) in hun originele organisme, *Lactococcus lactis*. S-componenten co-zuiverden het meest met fosfatidylglycerol (PG) en in mindere mate met cardiolipiden en traceerbare hoeveelheden van glycolipiden.

We hebben gepoogd het kantelingsmechanisme van de S-componenten te volgen. **Hoofdstuk 7** is een verzameling van resultaten van experimenten met crosslinking, het gebruik van een omgevingsgevoelige dye en FTIR spectroscopie om deze kanteling te demonstreren, maar geen van de methoden resulteerde in concluderende antwoorden. Het laatste experimentele hoofdstuk (**Hoofdstuk 8**) beschrijft ons onderzoek naar de optimalisatie van expressie vectoren voor de over-expressie van alle vier de componenten van ECF-transporters. Ons hoofddoel hierbij was om aanpasbare expressie van ECF-transporters te verkrijgen en daarnaast vectoren te maken die geen identieke stukken DNA van de p2BAD vector bevatten.<sup>13</sup> Wij hebben twee typen expressie systemen gemaakt die voldoende hoeveelheid eiwit opleveren. Één systeem gebruikt twee aparte vectoren, de pBAD24 en de aangepaste pACYC met arabinose promoter om de ECF-module en S-component tot expressie te brengen. Het tweede systeem is gebaseerd op de pBAD24 vector met een linker die een RBS bevat tussen de genen van de

ECF-module en de S-component. Beide expressie systemen zorgen voor een eiwitproductie vergelijkbaar met de p2BAD vector.